

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Staphylococcus aureus*

2.1.1. Definisi

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *Staphylococcus aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri. Berbagai derajat hemolisis disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dan kadang-kadang oleh spesies *Staphylococcus* lainnya. (Jawetz *et al.*, 2008).



Gambar 1. *Staphylococcus aureus* hasil pewarnaan Gram pembesaran lensa objektif 1000x (Karimela *et al*, 2017).

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* yaitu:

Domain : Bacteria
 Kingdom : Eubacteria
 Filum : Firmicutes
 Kelas : Bacilli
 Ordo : Bacillales
 Famili : Staphylococcaceae
 Genus : Staphylococcus
 Spesies : *S. aureus*
 Nama binomial : *Staphylococcus aureus*

2.1.2. Patogenesis *Staphylococcus aureus*

Kolonisasi dari *Staphylococcus aureus* 30% berada pada lubang hidung orang sehat, dapat pula ditemukan pada permukaan kulit. Infeksi dari *Staphylococcus aureus* dapat terjadi apabila dijumpai sisi lemah dari penjamu, seperti kulit yang terluka misalnya infeksi pada luka operasi. *Staphylococcus aureus* juga dapat masuk melalui membran mukosa misalnya pada pneumonia akibat penggunaan ventilator. *Staphylococcus aureus* mampu bertahan hidup dan mengakibatkan berbagai manifestasi klinis karena memiliki banyak faktor virulensi. *Staphylococcus aureus* menghasilkan peptidoglikan yang merupakan polimer pembentuk dinding sel bakteri, peptidoglikan berfungsi menghambat respon inflamasi dan memiliki *endotoxin-like-activity*. Bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki protein sel permukaan atau *Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMMs), seperti

clumping factors yang berikatan dengan fibrinogen, *fibronectin-binding proteins* yang berikatan dengan fibronektin, kolagen, dan *bone sialoprotein-binding proteins*. Protein permukaan tersebut bersama-sama memperantarai perlekatan bakteri ke jaringan inang. Keberadaan faktor tersebut dihubungkan dengan terjadinya endokarditis, osteomielitis, septik arthritis, dan infeksi akibat penggunaan alat prostetik serta kateter (Utaminingsih, 2015).

Mikrokapsul dan protein A pada *Staphylococcus aureus* membantu menghambat proses fagositosis. Protein A adalah komponen utama dari dinding sel *Staphylococcus aureus*, protein ini akan berikatan dengan sisi Fc dari IgG, membentuk anti opsonin sehingga dapat memiliki efek antifagosit yang kuat. *Staphylococcus aureus* juga menghasilkan beberapa enzim seperti protease, lipase, elastase, hialuronidase, dan kinase yang memungkinkan *Staphylococcus aureus* untuk menginvasi dan merusak jaringan inang sehingga *Staphylococcus aureus* mampu bermetastasis ke berbagai organ (Utaminingsih, 2015).

Staphylococcus aureus mampu menghasilkan enzim katalase yang berperan dalam proses pengubahan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi hidrogen (H_2) dan oksigen (O_2), karena hal tersebut *Staphylococcus aureus* dikatakan bersifat katalase positif dimana hal ini dapat membedakannya dari genus *Streptococcus*. *Staphylococcus aureus* juga menunjukkan kemampuan untuk menghasilkan enzim koagulase yang dapat membedakannya dari *Staphylococcus* jenis lainnya, seperti *Staphylococcus epidermidis*. *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan untuk memfermentasikan manitol menjadi asam, hal ini dapat dibuktikan bila

Staphylococcus aureus dibiakkan dalam agar Manitol, dimana terjadi perubahan pH dan juga perubahan warna dari merah ke kuning (Pandia, 2015).

Faktor virulensi lain yang dapat digunakan untuk menghindari sistem imun adalah koagulase yang mana enzim ini dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat. Enzim koagulase akan berikatan dengan protombin sehingga mengaktifkan polimerasi fibrin dan membentuk deposit fibrin pada permukaan kuman yang berfungsi untuk menghambat fagositosis (Utaminingsih, 2015).

Patogenitas *Staphylococcus aureus* disebabkan karena produksi toksin dimana toksin tidak akan bekerja sebelum bakteri berhasil masuk dan bertahan dalam tubuh hospes, pada fase awal inilah koagulase berperan sebagai faktor virulensi dengan melindungi bakteri dari fagositosis sehingga bakteri dapat menimbulkan infeksi dan melakukan multiplikasi (Smith *et al.*, 1947). Ada dua jenis produksi koagulase yaitu koagulase bebas (*free coagulase*) dan koagulase terikat (*bound coagulase*). Bakteri yang membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Jawetz *et al.*, 2001).

Staphylococcus aureus memiliki *membrane-damaging toxin* yaitu hemolisin, leukotoksin, leukosidin yang merusak membran sel eukariotik. Leukosidin bekerja dengan membentuk pori pada membran sel leukosit sehingga menyebabkan kerusakan sel leukosit. Eksotoksin seperti SEA sampai SEG, TSST, ET dapat menimbulkan keracunan makanan, *toxic shock syndrome*, *scalded skin syndrome*, *bullous impetigo* dan sindroma sepsis, sedangkan strain CA-MRSA memiliki eksotoksin yang dinamakan *Pantone Valentine Leukodin* (PVL). PVL ini dapat

menyebabkan lisisnya *Polymorphonuclear Neutrophils* (PMN) dan melepaskan *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan nekrosis jaringan (Utaminingsih, 2015).

Bakteri *Staphylococcus aureus* mampu membuat biofilm di jaringan inang maupun di permukaan alat prostetik serta dapat membentuk *small-variant colony* (SVCs) yang dapat bersembunyi dalam sel inang tanpa menyebabkan kerusakan signifikan pada sel. Hal tersebut dapat membuatnya terlindung dari efek antibiotik dan mekanisme pertahanan tubuh. Keberadaan faktor-faktor tersebut menimbulkan manifestasi klinis dari infeksi *Staphylococcus aureus* menjadi sangat luas mulai dari keracunan makanan, infeksi kulit ringan sampai dengan infeksi berat yang mengancam jiwa bila terjadi bakterimia, dan bermetastasis ke berbagai organ, pada otak dapat mengakibatkan meningitis, abses otak dan serebritis (Utaminingsih, 2015).

2.2. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

2.2.1. Definisi

Methicillin Resistant Staphylococcus aureus atau MRSA adalah jenis *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik metisilin. MRSA juga resisten terhadap antibiotik betalaktam, makrolida, tetrasiklin, kloramfenikol, dan kuinolon. Infeksi MRSA merupakan infeksi oportunistik, sama halnya dengan infeksi *Staphylococcus aureus* (Putri, 2015). MRSA pertama kali diuraikan pada tahun 1961, dan sejak saat itu menjadi permasalahan di berbagai negara di dunia (Utaminingsih, 2015). *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan salah satu agen penyebab infeksi nosokomial yang utama. Bakteri MRSA berada di

peringkat keempat sebagai agens penyebab infeksi nosokomial setelah *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterococcus*. Lebih dari 80% strain *S. aureus* menghasilkan penicilinase, dan *penicillinase-stable betalactam* seperti *Methicillin*, *cloxacillin*, dan *fluoxacillin* yang telah digunakan sebagai terapi utama dari infeksi *S. aureus* selama lebih dari 35 tahun. Strain yang resisten terhadap kelompok penicillin dan beta-lactam ini muncul tidak lama setelah penggunaan agen ini untuk pengobatan (Biantoro, 2008).

2.2.2 Epidemiologi

MRSA merupakan galur *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotika metisilin sebagai akibat dari penggunaan antibiotika yang tidak rasional. MRSA tersebar hampir di seluruh dunia, dengan insiden tertinggi terdapat di area yang densitasnya padat dan kebersihan individunya rendah. Bakteri MRSA biasanya dikaitkan dengan pasien di rumah sakit. Di Inggris sampai dengan tahun 2004 didapatkan data prevalensi bahwa MRSA menjadi masalah yang predominan pada usia lanjut 82% usia > 60 tahun, strain MRSA yang ada 92% resisten terhadap fluoroquinolone dan 72% resisten terhadap makrolid, sebagian besar isolat masih sensitif terhadap tetrasiklin, asat fusidat, rifampicin, dan gentamisin, dan strain MRSA yang telah diuji 12% resisten terhadap mupirocin (Gemmell *et al*, 2006).

MRSA dibagi menjadi 2 kelompok yaitu *Hospital-Acquired MRSA* (HA-MRSA) dan *Community-Acquired MRSA* (CA-MRSA). Definisi HA-MRSA menurut *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) adalah infeksi MRSA pada individu yang pernah dirawat di rumah sakit atau menjalani operasi dalam 1 tahun

terakhir, menggunakan alat bantu medis dan berada dalam perawatan jangka panjang. HA-MRSA memiliki resistensi yang sangat tinggi dan merupakan penyakit nosokomial yang penting. Faktor risiko infeksi HA-MRSA adalah pasien dengan luka operasi, ulkus dekubitus, dan pengguna kateter intravena. CA-MRSA adalah MRSA yang terjadi dalam suatu komunitas, disebabkan adanya perpindahan bakteri dari suatu individu yang sudah terinfeksi MRSA ke individu sehat yang belum pernah mendapatkan pengobatan di tempat pelayanan kesehatan, pertama kali ditemukan tahun 1990. Berbeda dengan HA-MRSA, strain CA-MRSA memiliki komposisi lebih kecil, memiliki virulensi lebih tinggi, dan jarang terjadi *multidrug resistance* pada antibakteri non betalaktam (Utaminingsih, 2015).

2.2.3. Klasifikasi

Pada awal tahun 1990 telah muncul MRSA yang didapatkan pada individu yang sebelumnya tidak memiliki faktor risiko yang berhubungan dengan MRSA. Keadaan ini disebut sebagai *community-acquired* MRSA (CA-MRSA). Community-Acquired MRSA terjadi pada penderita dengan riwayat rawat inap rumah sakit maupun tidak. Tempat pelayanan umum, sekolah, penjara dan tempat yang penduduknya padat mudah ditemukan bakteri tersebut. Abses, luka bakar ataupun luka gigitan serangga dapat dijadikan CA-MRSA sebagai tempat berkembang. Sekitar 75% infeksi terjadi pada kulit dan jaringan lunak (Gorwitz, 2006).

CA-MRSA dapat diklasifikasikan kedalam empat kategori, yaitu :

- a. Pasien di rumah sakit dan staf di rumah sakit dengan MRSA.
- b. Perawat dirumah dengan MRSA.

c. Penyebaran MRSA pada pasien yang tidak dirawat di rumah sakit.

d. MRSA yang timbul di masyarakat secara *de novo*.

Healthcare-associated MRSA (HA-MRSA) oleh *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* didefinisikan sebagai infeksi MRSA yang terdapat pada individu yang pernah dirawat di rumah sakit atau menjalani tindakan operasi dalam 1 tahun terakhir, memiliki alat bantu medis permanen dalam tubuhnya, bertempat tinggal di fasilitas perawatan jangka panjang atau individu yang menjalani dialisis. HA-MRSA secara tipikal dihubungkan dengan seseorang yang memiliki faktor risiko perawatan di rumah sakit atau panti, dialisis, mendapat terapi antibiotik, atau terpapar oleh alat atau prosedur yang invasif. HA-MRSA memiliki resistensi yang sangat tinggi dan merupakan penyakit nosokomial yang penting (Anderson *et al*, 2007). Secara genetik dan fenotipe strain HA-MRSA berbeda dengan strain CA-MRSA. CA-MRSA memiliki komposisi yang lebih kecil, mengalami kejadian virulensi yang lebih tinggi, dan jarang terjadi *multidrug resistant* pada antimikroba non β -laktam (misalnya terhadap tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol, rifampin, clindamycin, dan fluoroquinolone) (Vavra *et al*, 2007).

2.2.4. Mekanisme Resistensi

Sejarah resistensi bakteri terhadap antibiotika diawali dari ditemukannya *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap penicillin pada awal 1940-an. Sejak itu resistensi tunggal maupun multiple (multidrug resistance) yang dimediasi oleh plasmid yang dapat dipindahkan dari satu ke lain mikroorganisme di traktus gastrointestinal juga dilaporkan sekitar tahun 1950-an. Pada pertengahan 1970-an

gen-gen resisten ditemukan semakin menyebar di berbagai pelayanan kesehatan dan bahkan melibatkan organisme-organisme yang bersifat komensal di traktus respiratorius dan genitourinarius penderita yang dirawat di rumah sakit. Penyebaran bakteri resisten semakin dramatik di pertengahan 1990-an (Dwiprahasto, 2005).

Resistensi bakteri terhadap antimikroba terjadi melalui banyak mekanisme dan cenderung semakin rumit pendeteksiannya. Berbagai mekanisme genetik ikut terlibat, termasuk di antaranya mutasi kromosom, ekspresi gen-gen resisten kromosom laten, didapatnya resistensi genetik baru melalui pertukaran langsung DNA, bakteriofag, atau plasmid DNA ekstrakromosom, ataupun didapatnya DNA melalui mekanisme transformasi (Dwiprahasto, 2005).

Staphylococcus aureus berubah menjadi galur resisten metisilin (MRSA) karena mendapat sisipan suatu elemen DNA berukuran besar antara 20-100 kb yang disebut SCCmec. SCCmec selalu mengandung *mecA*, yaitu gen yang menyandi PBP2a (Valencia, 2015). Eksperimen dan eksplorasi genetik menunjukkan bahwa mekanisme resistensi terhadap antimikroba betalaktam diperankan oleh operon *mecA*. Operon *mecA* secara organisasi, struktur, fungsi dan mekanisme serupa dengan operon *blaZ* pada plasmid *Staphylococcus aureus* produsen betalaktamase. Regulator pada operon *blaZ* adalah *blaI* yang menyandi *DNA binding protein* berfungsi menekan transkripsi gen betalaktamase dan *blaR1* berupa *signal transduction* PBP yang akan menginduksi transkripsi jika ada betalaktam. Mekanisme ini analog dengan yang terjadi pada operon *mecA* yang dikendalikan oleh regulator *mecI* dan *mecR1*. Mayoritas isolat klinis MRSA sebelum tahun 1970

memiliki delesi pada gen *mecR1*. Diduga PBP2a pada isolat ini diproduksi secara konstitutif atau jika terjadi induksi kemungkinan berupa induksi silang dari *blaR1*. Pada isolat tahun 1980-an tidak ditemukan delesi pada regulator tetapi ditemukan polimorfisme pada *mecI* dan mutasi pada promotor *mecA*. Pada keadaan seperti ini terjadi penekanan atau perlambatan produksi PBP2a. Secara *in vitro* keadaan ini mendasari munculnya fenomena heteroresisten yaitu dalam satu biakan murni MRSA dapat ditemukan populasi sensitif dan populasi resisten sekaligus. Umumnya populasi yang resisten tumbuh lebih lambat dibandingkan populasi yang sensitif. Selain dipengaruhi oleh perbedaan aktivitas transkripsi gen *mecA*, heteroresisten kemungkinan juga dipengaruhi polimorfisme gen-gen disekitar gen *mecA* dan pengaruh gen-gen lain disekitar *SCCmec* seperti gen grup *hmr* dan gen grup *fem*. Sebagai dampak dari fenomena heteroresisten ini maka identifikasi MRSA yang hanya didasarkan pada pola kepekaan terhadap antimikroba atau identifikasi MRSA dengan mendeteksi PBP2a saja akan menjadi kurang akurat. Oleh karena itu para ahli merekomendasikan baku emas untuk identifikasi MRSA yaitu dengan cara mendeteksi keberadaan gen *mecA* dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) (Yuwono, 2010).

Mekanisme resistensi MRSA terhadap berbagai antimikroba nonbetalaktam diduga didasari adanya bukti bahwa *SCCmec* mengandung transposon dan *insertion sequences* seperti Tn554 pada ujung 5' *mecA* dan IS431 pada ujung 3' *mecA*. IS431 memiliki kemampuan rekombinasi dan dapat menjadi determinan resistensi terhadap merkuri, kadmium dan tetrasiklin. Gen lain yang berada di sekitar *SCCmec* seperti

gen *gyrA* diperkirakan juga berinteraksi dengan *SCCmec* mengakibatkan resistensi terhadap kuinolon (Yuwono, 2010).

2.3 Gen *Coa*

Koagulase merupakan suatu protein menyerupai enzim yang dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat. Bakteri *S. aureus* adalah salah satu bakteri yang menghasilkan enzim koagulase. Enzim koagulase juga merupakan faktor virulensi yang berperan penting dalam diagnosis *S. aureus*. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Carter & Darla 2004).

Enzim ini dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat, karena adanya faktor koagulase reaktif dalam serum yang bereaksi dengan enzim tersebut. Hasil akhir kerja enzim koagulase yaitu terjadinya peningkatan aktivitas penggumpalan fibrin (Jawetz et al, 2008).

Koagulase berperan pada pembentukan dinding fibrin disekeliling lesi *Staphylococcus*, yang membantu untuk bertahan dalam jaringan. Koagulase juga menyebabkan deposisi fibrin pada permukaan *Staphylococcus* yang memungkinkan melindungi bakteri dari fagositosis atau pengrusakan dalam sel fagosit (Jawetz et al. 2001).

Gen *Coa* adalah suatu gen penyandi enzim koagulase dan penanda adanya bakteri *S. aureus*. Amplifikasi gen *Coa* telah dianggap sebagai metode sederhana dan akurat untuk penanda isolat *S. aureus* yang berbeda, koagulase merupakan faktor virulensi yang penting sebagai penanda *S. aureus* (Da silva et al, 2005).

2.3.1 Patogenitas Enzim Koagulase

Bakteri *S. aureus* yang patogenik dan bersifat invasif menghasilkan koagulase dan cenderung untuk menghasilkan pigmen kuning bersifat hemolitik dan meragikan manitol. Infeksi lokal *S. aureus* adalah suatu infeksi folikel rambut, abses, infeksi peradangan yang hebat, terlokalisir, mengalami purnanahan sentral dan dapat sembuh dengan cepat apabila nanah dikeluarkan (Jawetz, 2005).

2.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Beberapa penelitian tentang gen Coa telah dilakukan menggunakan metode molekuler. *Polymerase Chain reaction* (PCR) merupakan suatu teknik perbanyakan (amplifikasi) potongan DNA dengan cara *in vitro* pada daerah spesifik yang dibatasi oleh dua buah primer oligonukleotida. Pada proses PCR dibutuhkan DNA untai ganda yang berfungsi sebagai cetakan (templat) yang mengandung DNA-target (yang akan di amplifikasi) untuk pembentukan molekul DNA baru, enzim DNA polimerase, deoksinukleosida trifosfat (dNTP), dan sepasang primer oligonukleotida (Gaffar, 2007).

2.4.1 Tahapan PCR

a. Denaturasi

Selama proses denaturasi, DNA untai ganda akan membuka menjadi dua untai tunggal. Hal ini disebabkan karena suhu denaturasi yang tinggi menyebabkan putusnya ikatan hidrogen diantara basa-basa yang komplemen. Pada tahap ini, seluruh reaksi enzim tidak berjalan, misalnya reaksi polimerisasi pada siklus yang sebelumnya. Denaturasi biasanya dilakukan antara suhu 90°C – 95°C .

b. Annealing

Pada tahap penempelan primer (*annealing*), primer akan menuju daerah yang spesifik yang komplemen dengan urutan primer. Pada proses *annealing* ini, ikatan hidrogen akan terbentuk antara primer dengan urutan komplemen pada templat. Proses ini biasanya dilakukan pada suhu $50^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$. Selanjutnya, DNA polymerase akan berikatan sehingga ikatan hidrogen tersebut akan menjadi sangat kuat dan tidak akan putus kembali apabila dilakukan reaksi polimerisasi selanjutnya, misalnya pada 72°C .

c. Extension

Umumnya, reaksi polimerisasi atau perpanjangan rantai ini, terjadi pada suhu 72°C . Primer yang telah menempel tadi akan mengalami perpanjangan pada sisi 3'-nya dengan penambahan dNTP yang komplemen dengan templat oleh DNA polymerase. Jika siklus dilakukan berulang-ulang maka daerah yang dibatasi oleh dua primer akan di amplifikasi secara eksponensial (disebut amplikon yang berupa untai ganda), sehingga mencapai jumlah copy yang dapat dirumuskan dengan $(2n)^x$. Dimana n adalah jumlah siklus dan x adalah jumlah awal molekul DNA. Jadi, seandainya ada 1 copy DNA sebelum siklus berlangsung, setelah satu siklus, akan menjadi 2 copy, sesudah 2 siklus akan menjadi 4, sesudah 3 siklus akan menjadi 8 kopi dan seterusnya. Sehingga perubahan ini akan berlangsung secara eksponensial. PCR dengan menggunakan enzim *Taq DNA polimerase* pada akhir dari setiap siklus akan menyebabkan penambahan satu nukleotida A pada ujung 3' dari potongan DNA

yang dihasilkan. Sehingga nantinya produk PCR ini dapat di kloning dengan menggunakan vektor yang ditambahkan nukleotida T pada ujung-ujung 5'-nya. Proses PCR dilakukan menggunakan suatu alat yang disebut *thermocycler*.

2.4.2 Komponen-Komponen *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

a. Template DNA

Template DNA adalah molekul DNA untai ganda yang mengandung sekuen target yang di amplifikasi. *Template* DNA mengandung urutan target yang akan ditambahkan pada PCR dalam bentuk single atau double strand. Faktor utama keberhasilan PCR tidak ditentukan oleh ukuran DNA . Berapapun panjang DNA, jika tidak mengandung sekuen yang diinginkan maka proses PCR tidak akan berhasil.

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan proses PCR adalah konsentrasi DNA. Jika konsentrasi DNA terlalu rendah, kemungkinan primer tidak dapat menemukan target. Tetapi jika konsentrasinya terlalu tinggi akan meningkatkan kemungkinan *mispriming* (Purnamasari, 2013).

b. Enzim

Dalam sejarahnya, PCR dilakukan dengan menggunakan Klenow fragment DNA Polimerase I selama reaksi polimerisasinya. Enzyme ini ternyata tidak aktif secara termal selama proses denaturasi, sehingga peneliti harus menambahkan enzim di setiap siklusnya. Selain itu, enzim ini hanya bisa dipakai untuk perpanjangan 200 bp dan hasilnya menjadi kurang spesifik. Untuk mengatasi kekurangan tersebut, dalam perkembangannya kemudian dipakai enzim Taq DNA polimerase yang memiliki

keaktifan pada suhu tinggi. Oleh karenanya, penambahan enzim tidak perlu dilakukan di setiap siklusnya, dan proses PCR dapat dilakukan dalam satu mesin (Hasibuan, 2015).

c. Primer

Primer merupakan oligonukleotida pendek rantai tunggal yang mempunyai urutan komplemen dengan DNA templat yang akan diperbanyak. Panjang primer berkisar antara 20-30 basa. Untuk merancang urutan primer, perlu diketahui urutan nukleotida pada awal dan akhir DNA target. Primer oligonukleotida di sintesis menggunakan suatu alat yang disebut *DNA synthesizer*.

d. Reagen lainnya

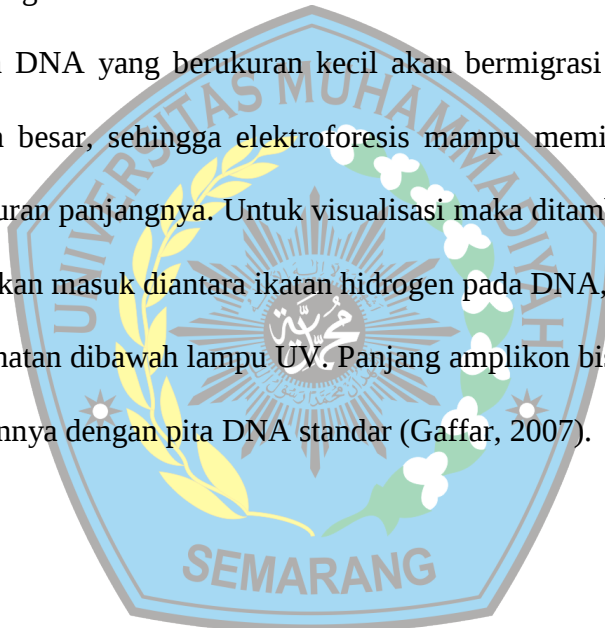
Selain enzim dan primer, terdapat juga komponen lain yang ikut menentukan keberhasilan reaksi PCR. Komponen tersebut adalah dNTP untuk reaksi polimerisasi, dan buffer yang mengandung $MgCl_2$. Konsentrasi ion Mg^{2+} dalam campuran reaksi merupakan hal yang sangat kritis. Konsentrasi ion Mg^{2+} ini sangat mempengaruhi proses primer annealing, denaturasi, spesifisitas produk, aktivitas enzim, fidelitas reaksi.

2.5. Elektroforesis Gel Agarosa

Metode ini didasarkan pada pergerakan molekul bermuatan dalam media penyangga matriks stabil di bawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan adalah gel agarosa atau poliakrilamid. Elektroforesis gel agarosa digunakan untuk memisahkan fragmen DNA yang berukuran lebih besar dari 100 pb dan dijalankan secara horizontal, sedangkan elektroforesis poliakrilamid dapat

memisahkan 1 pb dan dijalankan secara vertikal. Elektroforesis poliakrilamid biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA (sekuensing).

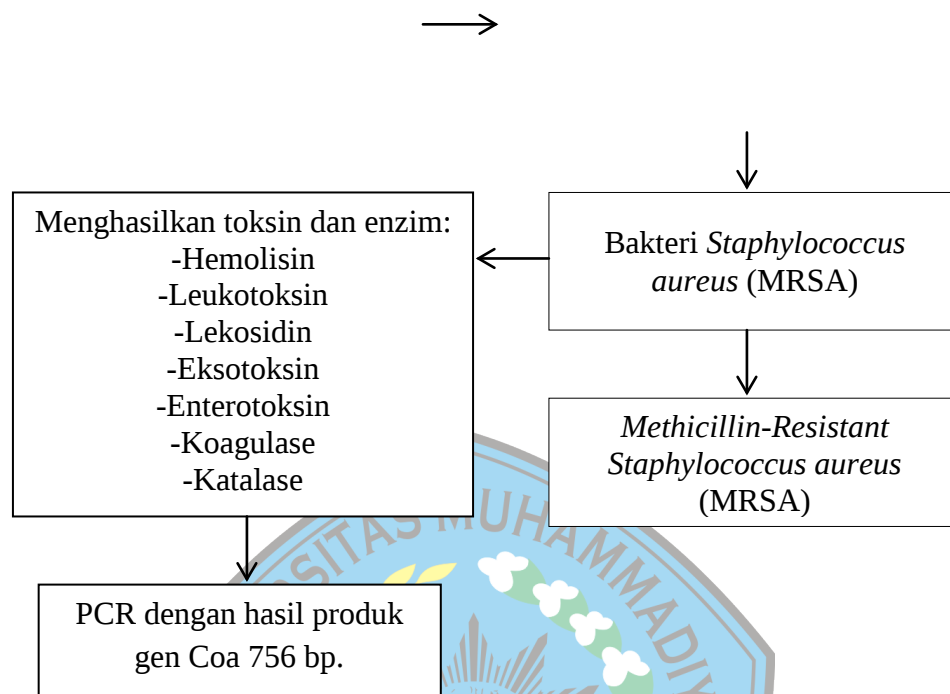
Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan ke dalam sumur-sumur yang terdapat pada gel agarosa dan diletakkan di kutup negatif, apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA akan bergerak ke kutup positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya. Untuk visualisasi maka ditambahkan larutan etidium bromida yang akan masuk diantara ikatan hidrogen pada DNA, sehingga pita fragmen DNA akan kelihatan dibawah lampu UV. Panjang ampikon bisa diperkirakan dengan membandingkannya dengan pita DNA standar (Gaffar, 2007).



2.6. Kerangka Teori

Gen *Coa* / Enzim koagulase digunakan sebagai penanda adanya bakteri *S. aureus*

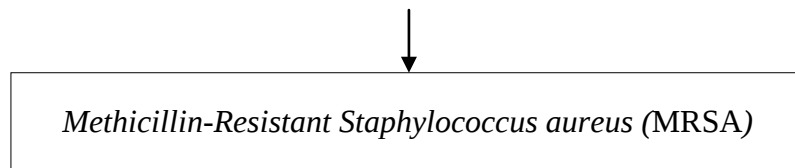
Enzim koagulase yaitu enzim yg dapat menggumpalkan plasma dan juga berperan sebagai faktor virulensi.



Skema 1. Kerangka teori deteksi gen Coa pada *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

2.7. Kerangka Konsep





Skema 2. Kerangka konsep deteksi gen *Coa* pada *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

